

# CONIC-SEMESP

## 13º Congresso Nacional de Iniciação Científica

Anais do Conic-Semesp. Volume 1, 2013 - Faculdade Anhanguera de Campinas - Unidade 3. ISSN 2357-8904

**TÍTULO:** COMPARAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA NAS BACTÉRIAS E. COLI E PSEUDOMONAS SPP

**CATEGORIA:** EM ANDAMENTO

**ÁREA:** CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE

**SUBÁREA:** BIOMEDICINA

**INSTITUIÇÃO:** CENTRO UNIVERSITÁRIO DAS FACULDADES METROPOLITANAS UNIDAS

**AUTOR(ES):** FELIPE DE ALMEIDA BONATTO, HELIENE ANA MORENO BREVE

**ORIENTADOR(ES):** ERICK CENDEL SAENZ TEJADA

Realização:



Apoio:



## 1. RESUMO

O diagnóstico de bactérias enteropatogênicas através da extração de DNA, esta sendo uma alternativa no diagnóstico de doenças microbianas. Este trabalho tem o intuito de elaborar um protocolo de extração de DNA das bactérias *Escherichia coli* e *Pseudomonas spp.* Assim foi realizada alterações nos protocolos de Khoodoo e Sambrook, além da utilização de Proteinase K e lavagens com clorofórmio. Os resultados preliminares mostraram a obtenção de DNA de boa qualidade em ambas as bactérias quando tratadas com PK e clorofórmio, denotando que o protocolo 1 foi mais eficiente para a extração de DNA de *Pseudomonas spp.*

## 2. INTRODUÇÃO

Os agentes etiológicos das infecções do trato urinário em geral são microrganismos de crescimento rápido. *Escherichia coli*, *Enterococcus spp*, *Klebsiella-Enterobacter spp*, *Proteus spp*, e *Pseudomonas spp.* representam a maioria dos isolamentos, tanto em pacientes hospitalizados quanto em ambulatoriais. Até 50% do total de infecções adquiridas em hospitais gerais são urinárias. A *Escherichia coli* é o microrganismo mais freqüente nas infecções não complicadas do trato urinário (FERREIRA *et al.*, 2011).

A parede celular das células procarióticas sempre foi uma grande vantagem para esses organismos, pois ela apresenta diversas características como elasticidade, resistência a pressão, a altas temperaturas e a valores extremos de pH. Essa característica faz com que a quebra da parede celular nas gram-positivas apresente maior dificuldade, que acaba por acarretar que as técnicas utilizadas para a quebra desta parede sejam muitas vezes trabalhosas, como a ruptura celular por sonicação, auxílio de enzimas tornado as técnicas mais custosas e demoradas (NOGUEIRA *et al.*, 2004).

As várias metodologias descritas para extração do DNA bacteriano são normalmente demoradas e de alto custo. Assim o presente trabalho visa a obtenção de um protocolo de extração de DNA de boa qualidade das bactérias *E. coli* e *Pseudomonas*.

## 3. OBJETIVO

Padronizar um protocolo de extração de DNA das bactérias *E. coli* e *Pseudomonas spp* de boa qualidade com eficiência e alto rendimento, com reagente de baixo custo e de uso rotineiro de laboratório.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Protocolo 1 - Extração com SDS:

Este protocolo de extração indicado por Khoodoo e col. (2002) Modificado. O pellet foi ressuspensão em 1000 µL de solução PBS e 2 µL de EDTA. Neste foi adicionado 60 µL de SDS 10%, e misturado com leve agitação e incubado à 60 °C durante 10 min, resfriado à temperatura ambiente. Neste foi adicionado 0,65 mL de fenol-clorofórmio, e agitado vigorosamente, centrifugado à 10.000 rpm durante 5 min, transferindo 500 µL da fase aquosa para outro tubo e realizado uma nova extração 500 µL fenol-clorofórmio, da fase aquosa foram retirados 500 µL e passado para um tubo novo e neste foi adicionado 10 µL de NaCl 5M, foi adicionado 300 µL de isopropanol, foi novamente centrifugar a 10.000 rpm durante 10 min e o precipitado de ácidos nucléicos lavados com etanol 70%.

### 4.2 Protocolo 2 - Extração com adição de SDS e Proteínase K:

Este protocolo de extração indicado por Sambrook e col. (1989) modificado. O pellet foi ressuspensão em 567µL de TE, em seguida foi adicionado 30 µL de SDS 10 % e 3 µL de proteinase K. As células com as soluções foram mantidas à 56 °C por 30 minutos sem agitação, em seguida foram realizadas duas extrações com 500 µL fenol-clorofórmio, da fase aquosa foram retirados 500 µL e colocada em outro microtubo novo de 1,5 mL, neste foi adicionado 10 µL de solução NaCl a 5 M e precipitado com dois volumes de etanol absoluto gelado. O DNA foi incubado à -20 °C por 10 minutos, em seguida centrifugado à 12000×g por 10min; o precipitado foi lavado com álcool 70%.

## 5. DESENVOLVIMENTO

O trabalho foi realizado com duas culturas das bactérias *E. coli* e *Pseudomonas* spp em meio líquido para a preparação de *pellet* bacterianos, que foram conservados a -20 °C para a fase de extração de DNA. A segunda etapa foi a elaboração dos protocolos de extração de DNA bacteriano onde os protocolos de extração indicado por Khoodoo foi nomeado de protocolo 1 e do Sambrook de protocolo 2, assim foram adaptados e modificados, e a comparação dos resultados entre eles foi visualizado por meio da eletroforese em gel de Agarose. Posteriormente, os DNA obtidos serão submetidos à digestão com enzimas de restrição para a comprovação da boa qualidade do material extraído.

## 6. RESULTADOS PRELIMINARES

Os resultados preliminares mostram que utilizando ambos os protocolos foi possível extrair DNA bacteriano. Assim o protocolo 1 foi o mais eficiente para a extração de DNA genômico para a bactéria *E. coli* segundo mostrado na figura 1 canaleta 1. Além disso, este protocolo se mostrou eficaz na extração de DNA total na bactéria *Pseudomonas* spp. O protocolo 2 se mostrou mais eficiente na extração de DNA plasmidial da bactéria *Pseudomonas* spp. segundo mostrado na canaleta 4, mas não foi eficiente para extrair DNA em *E. coli*. De acordo com nossos resultados parciais, podemos denotar que o protocolo 1 é melhor para extração de DNA genômico e o protocolo 2 é melhor para a extração de DNA plasmidial.

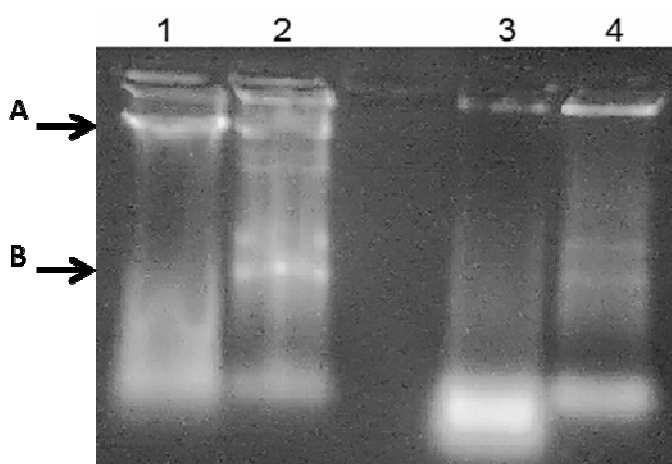


Figura 1 – Análise comparativa da extração de DNA através de eletroforese em gel de agarose ao 1%, em (1) *E. coli*, (2) *Pseudomonas* spp, através do protocolo 1 e, (3) *E. coli*, (4) *Pseudomonas* spp através do protocolo 2. Em (A) DNA genômico e (B) DNA plasmidial.

## 7. FONTES CONSULTADAS

FERREIRA, L.E. *et al.* Painel molecular para detecção de microrganismos associados à sepse. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. v. 23, n.1, 2011

KHOODOO, M. H. R.; ISSACK, M. I.; JAUFEEERALLY-FAKIM, Y. Serotyping and RAPD profiles of *Salmonella* enterica isolates from Mauritius. **Letters in Applied Microbiology**. v. 35, p. 146-152, 2002.

NOGUEIRA, C.A.M. *et al.* Desempenho de kits comerciais e protocolos laboratoriais para a extração de DNA genômico bacteriano. **Revista Panamericana de Infectologia**. v. 6, n. 2, p. 35-38, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2. Ed.. Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 1, 1989.